

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-137572

(43)Date of publication of application : 01.06.1993

(51)Int.Cl.

C12N 9/12
//(C12N 9/12
C12R 1:07)

(21)Application number : 03-326950

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 14.11.1991

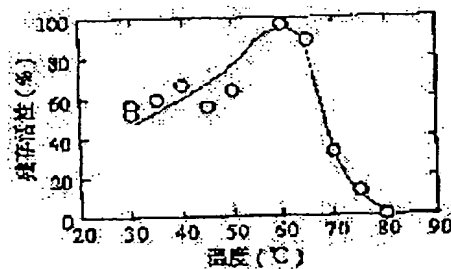
(72)Inventor : HAYASHI MAYUMI
MANABE MIKA
ONDA MASAOKI
TOKUMITSU SHINICHI
NAKAJIMA HIROSHI

(54) THERMOSTABLE ADENOSINE-5'-TRIPHOSPHATE SULFURYLASE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the subject enzyme, excellent in thermal stability, usable as a bioreactor and useful for producing adenosine 5'-phosphosulfate, etc., by culturing a bacterium of the genus *Bacillus* and collecting the resultant product from the culture.

CONSTITUTION: A bacterium of the genus *Bacillus* [e.g. *Bacillus coagulans* (ATCC 7050 strain)] is inoculated into a culture medium and cultured at 62° C for 4hr. The microbial cell is crushed and the resultant product is then subjected to nucleic acid removal and chromatography and purified to afford the objective thermostable adenosine-5'-triphosphate sulfurylase, capable of acting on adenosine 5'-triphosphate and sulfate ions, having the function to produce adenosine 5'-phosphosulfate, optimal pH of 7.5-8.0, action temperature of about 50-70° C, heat resistance in which the activity value of about 95% based on that before treatment is retained after the treatment in a buffer solution at about 60° C for about 15min and about 76000 molecular weight measured by the gel filtration method and usable as a bioreactor.



BEST AVAILABLE COPY

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

01.07.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-137572

(43)公開日 平成5年(1993)6月1日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C 1 2 N 9/12

7823-4B

// (C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:07)

審査請求 未請求 請求項の数2(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平3-326950

(22)出願日 平成3年(1991)11月14日

(71)出願人 000004503

ユニチカ株式会社

兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

(72)発明者 林 まゆみ

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72)発明者 真鍋 美香

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72)発明者 恩田 昌明

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

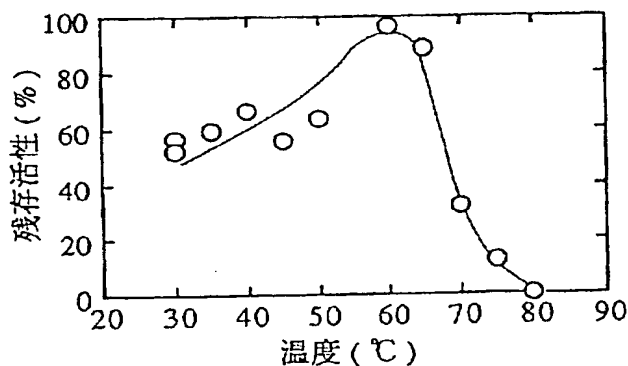
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフィラーゼ及びその製造法

(57)【要約】

【構成】 約60℃の緩衝液中で約15分間処理した後の活性が、処理前の活性の約95%の値を保持している耐熱性のアデノシン-5'-3リン酸スルフィラーゼ及び前記の耐熱性のアデノシン-5'-3リン酸スルフィラーゼの産生能を有するバチルス属の細菌を一般的栄養培地を用いて培養し、菌体破碎後、必要に応じて、除核酸・クロマトグラフィー等の操作により、約60℃の緩衝液中で約15分間処理した後の活性が、処理前の活性の約95%の値を保持している耐熱性のアデノシン-5'-3リン酸スルフィラーゼを取得する。

【効果】 バイオリアクターに有用に用いる性質を有する耐熱性のアデノシン-5'-3リン酸スルフィラーゼを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の理化学的性質を有する耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフリラーゼ。

(イ) 作用：アデノシン-5'-3リン酸と硫酸イオンに作用し、アデノシン-5'-ホスホスルフェートを生成する。

(ロ) 至適 pH：約 7.5～約 8.0 である。

(ハ) 作用適温：約 50℃～約 70℃である。

(ニ) 耐熱性：約 60℃の緩衝液中で約 15 分間処理した後の活性が、処理前の活性の約 95%の値を保持している。

(ホ) 分子量：約 76000 (ゲル濾過法)。

【請求項 2】 バチルス属の細菌 (*Bacillus* sp.) を培養し、培養物から以下の理化学的性質を有する耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフリラーゼを採取することを特徴とする耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフリラーゼの製造法。

(イ) 作用：アデノシン-5'-3リン酸と硫酸イオンに作用し、アデノシン-5'-ホスホスルフェートを生成する。

(ロ) 至適 pH：約 7.5～約 8.0 である。

(ハ) 作用適温：約 50℃～約 70℃である。

(ニ) 耐熱性：約 60℃の緩衝液中で約 15 分間処理した後の活性が、処理前の活性の約 95%の値を保持して

いる。

(ホ) 分子量：約 76000 (ゲル濾過法)。

【発明の詳細な説明】

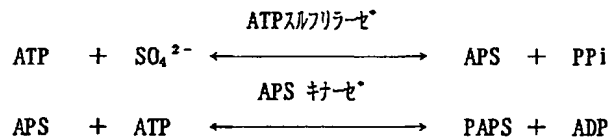
【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、熱安定性に優れたバイオリクターに有用に用いる性質を有する耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフリラーゼ (以下、ATPスルフリラーゼという。) 及びその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルフェート (以下、PAPSという) は、微生物から植物、高等動物に至るまで広く分布する硫酸基供与体である。生体中の PAPS とプロテオグロカン疾患に代表されるいくつかの疾患との関わりが報告されている [ブレインリサーチ (Brain Research), Vol. 20, p. 341-360 (1970)]。このように、PAPS の生体内での役割は非常に重要であり、医薬などの分野に高い利用価値があると考えられる。PAPS は、下記のように、アデノシン-5'-3リン酸 (以下、ATP という。) から、ATP スルフリラーゼとアデノシン-5'-ホスホスルフェートキナーゼ (以下、APS キナーゼという。) の二つの酵素の働きで合成される物質である。

【0003】



(式中、APS は、アデノシン-5'-ホスホスルフェートを表す。)

【0004】 従来、PAPS 合成に重要である酵素の一つである ATP スルフリラーゼは、湿菌体当たりの含量が非常に低く、そのために PAPS を大量に合成できないという問題点があった。また、パン酵母 (*Dry baker's yeast*, Sigma YSC-1) の ATP スルフリラーゼを 30℃で保温したところ、1 時間で残存活性が約 7% しかなく、ATP スルフリラーゼは非常に熱に不安定であり、この酵素と APS キナーゼを用いて、PAPS を効率的に合成することが出来なかった。

【0005】 上述のような理由から、PAPS を効率的に合成する場合や、APS と病態との関連を調べるために本酵素の逆反応を利用して体液中の APS 濃度の測定等に利用しようとする場合、工業的に実施できるものがなく、実用化することが強く要望されていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記したような観点から、安定性の高い ATP スルフリラーゼ及びその製造法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、安定性の

高い ATP スルフリラーゼを効率よく得ることを目的として鋭意研究した結果、バチルス・アシドカルダリウス (*Bacillus acidocaldarius*)、バチルス・コアギュランス (*B. coagulans*)、バチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・シェレゲリ (*B. schlegelii*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) などのバチルス属の細菌が、上記の性質を有する ATP スルフリラーゼを生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 すなわち、本発明は、以下の理化学的性質を有する耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフリラーゼ及び：

(イ) 作用：ATP と SO_4^{2-} に作用し、APS を生成する。

(ロ) 至適 pH：約 7.5～約 8.0 である。

(ハ) 作用適温：約 50℃～約 70℃である。

(ニ) 耐熱性：約 60℃の緩衝液中で約 15 分間処理した後の活性が、処理前の活性の約 95%の値を保持している。

(ホ) 分子量：約 76000 (ゲル濾過法)。

バチルス属の細菌 (*Bacillus* sp.) を培養し、培養物から以下の理化学的性質を有する耐熱性アデノシン-5'

ー3リン酸スルフリラーゼを採取することを特徴とする耐熱性アデノシン-5'-3リン酸スルフリラーゼの製造法を要旨とするものである。

(イ) 作用：ATPと SO_4^{2-} に作用し、APSを生成する。

(ロ) 至適pH：約7.5～約8.0である。

(ハ) 作用適温：約50℃～約70℃である。

(ニ) 耐熱性：約60℃の緩衝液中で約15分間処理した後の活性が、処理前の活性の約95%の値を保持している。

(ホ) 分子量：約76000（ゲル濾過法）。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の耐熱性ATPスルフリラーゼは以下の理化学的性質を有するものである。

(イ) 作用：ATPと SO_4^{2-} に作用し、APSを生成する。

(ロ) 基質特異性：正反応においては、硫酸塩およびATPが基質となる。しかし、AMPには実質上作用しない。逆反応においては、APSとピロリン酸塩が基質となる。

(ハ) 至適pH：後述する力価の測定法に従い、用いる緩衝液のpHを変えて力価を測定した結果、図1に示すとおり約7.5～8.0である。

(ニ) 安定pH：pH5.0～10.0の緩衝液中で、4℃、22時間保存した後、後述する力価の測定法に従って力価を測定した。その結果は図2に示すとおり約5.0～7.5である。

(ホ) 作用適温：温度を20℃～80℃に変え、後述の方法で力価の測定を行った。作用適温は約50℃～約70℃である。

(ヘ) 耐熱性：約60℃の緩衝液中で約15分間処理した後、後述する力価の測定法により活性を測定した結果、処理前の活性の95%の値を保持している。

(ト) 分子量：ゲル濾過法により分子量を測定した。分子量は約76000である。

【0010】(チ) 力価の測定法：測定原理は、ATPと H_2O を基質として酵素を作用させると、AMPとピロリン酸が生成する。これにピロホスファターゼを作用させ、生じた無機リン酸を定量するものである。

【試薬】

基質：100mM ATP

緩衝液：100mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)

酵素：70u/ml ピロホスファターゼ（ペーリンガーマンハイム山之内社製）

その他塩類：100mM モリブデン酸ナトリウム

1 M 塩化マグネシウム

キット：ホスファC-テストワコー（和光純薬社製）

【操作】上記基質ATP50μlと、緩衝液50μlと、モリブデン酸ナトリウム50μlと、塩化マグネシウム5μlと、ピロホスファターゼ3μlを攪拌混和し

た後、酵素溶液100μlを加えて30℃で10分間反応させる。反応終了後、3規定硫酸を50μl加えて攪拌混和し、反応を停止させる。生成した無機リン酸を無機リン酸測定用キットを用いて定量する。盲検として、酵素溶液無添加のものについて同様に処理したのを用いる。酵素活性の表示は、1分間に2μmolのリン酸（1μmolのピロリン酸）を生成する酵素量を1Uとする。

【0011】本発明の耐熱性ATPスルフリラーゼは、バチルス属の細菌から得られるものであり、そのようなバチルス属の細菌としては、例えばバチルス・アシドカルダリウス (*Bacillus acidocaldarius*)、バチルス・コアギュランス (*B. coagulans*)、バチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・シュレゲリ (*B. schlegelii*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)などがあげられる。

【0012】次に本発明の耐熱性ATPスルフリラーゼの製造法について説明する。本発明の耐熱性ATPスルフリラーゼの製造法は、上記したようなバチルス属の細菌を培養し、その培養物から耐熱性のATPスルフリラーゼを採取するものである。本発明におけるバチルス属の細菌を培養するに際して用いられる栄養培地において、炭素源として、例えば、グルコース、シュークロース、フルクトース、澱粉加水分解物、糖蜜、亜硫酸パルプ廃液の糖類、酢酸、乳酸等の有機酸類、さらには使用する細菌が資化するアルコール類、油脂、脂肪酸およびグリセリン等が使用でき、窒素源として、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、アミノ酸、ペプトン、肉エキス、酵母エキス等の無機または有機物が使用できる。さらに無機塩類として、例えば、カリウム、ナトリウム、リン酸、亜鉛、鉄、マグネシウム、マンガン、銅、カルシウム、コバルト等の各塩類、必要に応じて微量金属塩、コーンステーパーリカー、ビタミン類、核酸等を使用してもよく、細菌の一般的栄養培地が使用できる。これらの培地を用いて、バチルス属の細菌を20～80℃、好ましくは40～70℃、最適には60℃で、2～6時間、好氣的に培養すればよい。

【0013】本発明で細胞破砕液を得る手段としては、例えば、培養物から菌体を集菌したのち、ホモジナイザー、ブレンダー、マントンゴーリン、ダイノミル、フレンチプレス、超音波処理、凍結融解、リゾチーム処理等により細胞を破砕して得ることが出来る。

【0014】次に上記細胞破砕液（細胞抽出液）にカチオン系高分子凝集剤を添加して、細胞破砕片及び核酸を沈澱させる。本発明に用いられるカチオン系高分子凝集剤としては、例えば、ポリアミノアルキルメタアクリレート類、ポリアミノアルキルメタアクリレートとアクリルアミドの共重合物類、ポリアクリルアミドのマンニツヒ変性物類、ポリジメチルジアリルアンモニウム塩類、

ポリビニルイミダゾリン類、ポリアクリルアミド類、アミン系重縮合物類などがあげられる。その際の高分子凝集剤の添加量としては、凝集剤の種類によって異なるが、破碎した微生物の乾燥重量 100 重量部に対し 1~40 重量部が好ましい。このカチオン系高分子凝集剤を予め水に溶解した後、細胞破碎液に添加して 10 分から 24 時間攪拌する。また、pH の調整が必要な場合には、適宜 10~200 mM になるように緩衝液を加えることもできるし、蛋白質の安定化のために、グルコースを細胞破碎液 100 重量部に対し、1~50 重量部添加してもよい。

【0015】次いで沈澱させた細胞破碎片及び核酸を分離する。そのためには、例えば、静置するか、遠心分離するか、あるいは濾過するかして行えばよい。これらの操作により、粗酵素標品を得ることができる。さらに高度に精製された酵素標品を得るには、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィーを用いることができる。本発明の APS キナーゼは、特にアフィニティークロマトグラフィーを用いた場合、精製倍率が高くなり、より好ましい。上記のような方法により、本発明の APS キナーゼの標品が得られる。

【0016】

【実施例】以下に本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、酵素標品の蛋白質量は、280 nm の吸光 1 を蛋白質 1 mg/ml と仮定して求めた。

実施例 1

グルコース濃度 1%、酵母エキス濃度 1%、リン酸濃度 0.1% 及び若干のミネラルを含んだ培地を殺菌した後、pH を 6.5 に調整し、バチルス・ステアロサーモフィルス (NCA1503 株) を接種し、培養を行った。60℃で 3 時間培養後、培地中のグルコースが消費されたことを確認し、遠心分離にて集菌して菌体を得た。上記のようにして得られた湿菌体を凍結融解法で破碎したのち、ポリアクリルアミド系の高分子凝集剤を用いて除核酸を行った。生じた沈澱を遠心分離で除去して、上清を得た。

【0017】あらかじめ 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-セファロースカラムに上清をアプライしたところ、ATP スルフィラーゼが吸着されたので、同緩衝液で十分洗浄したのち、同緩衝液を用いて 0 から 500 mM の塩化ナトリウムの直線濃度勾配にて溶出を行った。その活性画分を回収し、1 M となるよう硫酸アンモニウムを加えた。これを 1 M 硫酸アンモニウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化したフェニルセファロースカラムにアプライした。同緩衝液で十分洗浄した後、50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 を送液した。得られた活性画分を回収し、濃縮、透析した後、50 mM トリス塩酸緩衝液 pH

7.5 で平衡化したマトリックスゲルブルー A カラムにアプライした。同緩衝液で十分洗浄した後、1 M 塩化カリウムを含む同緩衝液を送液した。活性画分を回収し、ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、単一なバンドが得られた。

【0018】酵素標品の比活性は、12.1 U/mg であった。得られた酵素標品について、理化学的諸性質を調べたところ前記した (イ) から (チ) に記載した性質を有していた。

【0019】実施例 2

グルコース濃度 0.7%、酵母エキス濃度 0.8%、リン酸濃度 0.05% 及び若干のミネラルを含んだ培地を殺菌した後、pH を 7.0 に調整し、バチルス・コアギュランス (ATCC7050 株) を接種し、培養を行った。62℃で 4 時間培養後、培地中のグルコースが消費されたことを確認し、遠心分離にて集菌して菌体を得た。上記のようにして得られた湿菌体をフレンチプレスにて破碎したのち、ポリアクリルアミド系の高分子凝集剤を用いて除核酸を行った。生じた沈澱を遠心分離で除去して、ATP スルフィラーゼを含む粗抽出液を得た。

【0020】あらかじめ 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-セファロースカラムに上清をアプライしたところ、ATP スルフィラーゼが吸着されたので、同緩衝液で十分洗浄したのち、同緩衝液を用いて 0 から 0.4 M の塩化ナトリウムの直線濃度勾配にて溶出を行った。その活性画分を回収し、濃縮した。これを 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を溶出液に用いたウルトロゲル ACA34 カラムクロマトグラフィーにより分画し、活性画分を得た。活性画分を回収し、同緩衝液で平衡化したヒドロキシルアパタイトカラムにアプライした。同緩衝液で十分洗浄した後、100 mM リン酸二カリウムを含む同緩衝液を送液した。濃縮後、ポリアクリルアミド電気泳動で単一なバンドを与えるまで精製できた。

【0021】この酵素標品の比活性は、10.5 U/mg であった。得られた酵素標品について、理化学的諸性質を調べたところ前記した (イ) から (チ) に記載した性質を有していた。

【0022】

【発明の効果】本発明の ATP スルフィラーゼは、従来知られている ATP スルフィラーゼに比べ、はるかに熱安定性に優れているため、産業界に与えるメリットは甚大である。

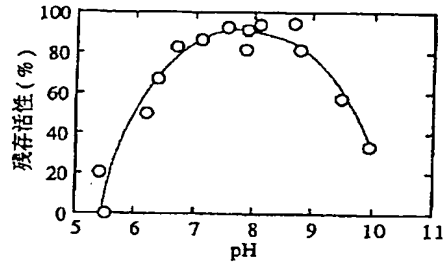
【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の ATP スルフィラーゼの至適 pH 曲線を示す図である。

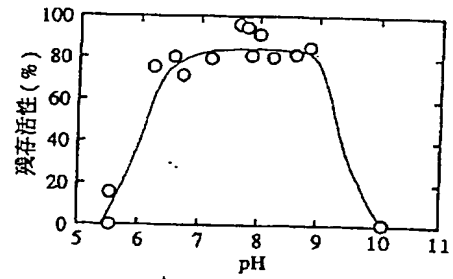
【図 2】本発明の ATP スルフィラーゼの pH 安定性曲線を示す図である。

【図 3】本発明の ATP スルフィラーゼの熱安定性 (耐熱性) を示す図である。

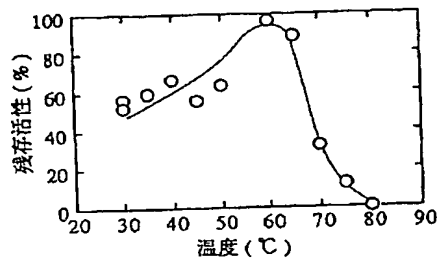
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 徳光 伸一
京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株
式会社中央研究所内

(72)発明者 中島 宏
京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株
式会社中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.